Vergleichende Untersuchung

über die verschiedenen

Varietäten des Bacillus pyocyaneus

und des

Bacillus fluorescens liquefaciens

von

Dr. Erminio Niederkorn.

Vergleichende Untersuchung

über die verschiedenen

Varietäten des Bacillus pyocyaneus

und des

Bacillus fluorescens liquefaciens.

Inaugural-Dissertation

der

mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Freiburg in der Schweiz

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Erminio Niederkorn aus Gorizia

(Friaul).

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

BERN
BUCHDRUCKEREI GOTTFR. ISELI
1898.

Ai suoi Genitori,

con figliale riconoscente affetto

dedica

L' Autore.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545307_0047

Einleitung.

Sowohl der Bacillus pyocyaneus als der Bacillus fluorescens liquefaciens mit ihren verschiedenen Abarten gehören bekanntlich zu den niederen Pilzen und zwar zu der Unterabteilung der Spaltpilze: Gattung Bacillus.

Obwohl man anfangs diesen beiden Bacillenarten eine saprophytische Natur zuschrieb, indem man sich begnügte, in dem Bacillus pyocyaneus nur den Erreger des blauen Eiters anzusehen, so hatte doch die gleich darauf bemerkte und festgestellte pathogene Eigenschaft desselben einerseits, und namentlich aber die beiden Arten zukommende Besonderheit der charakteristischen Farbstoffe, welche sie als Stoffwechselprodukt ihrer Lebensthätigkeit in den verschiedenen Nährböden absondern, anderseits zur Folge, dass sich zeitig schon die Aufmerksamkeit der Bakteriologen denselben zuwandte. Schon im Jahre 1859 hatte *Fordos*[1]) aus dem blauen Eiter einen Farbstoff gewonnen, den er Pyocyanin nannte, und welcher, wie durch die späteren Arbeiten von *Lücke*[2]) 1862, von *Girard*[3]) 1875 und namentlich von *Gessard*[4]) 1882, und 1884 von *Charrin*[5]) erklärt werden konnte, durch Mikroorganismen bedingt war. *Gessard* gelang es thatsächlich, aus dem blaugrün gefärbten Eiter einen Mikroben zu erhalten, den er als die Ursache dieser Färbung erkannte und Bacillus pyocyaneus nannte. Diese Forscher scheinen aber mit nicht reinen Kulturen gearbeitet zu haben, da sie diesen

[1]) Compt. rend. de l'Acad. de sciences, Bd. 51.
[2]) Blauer Eiter. Archiv für klinische Chir.
[3]) Unters. über blauen Eiter. Chrg. C. Bl. II.
[4]) De la pyocyanine et de son microbe. Thèse de Paris.
[5]) Commun. faite à la Soc. anat.

Pilz sowohl in morphologischer wie in biologischer Hinsicht nicht so beschrieben wie er sich uns jetzt, mit Hilfe der Gelatineplatten isoliert gezüchtet, thatsächlich präsentiert. Sie beschreiben ihn gewöhnlich als runden oder ovalen Micrococcus, und *Charrin* schreibt ihm noch alle möglichen Formveränderungen zu, je nach den Nährböden. Von nun an wurde dieser auffallende Bacillus immer gründlicher studiert, umsomehr, da man auch seine Virulenz anerkannte und zugleich auch andere Mikroorganismen harmloser Natur auffand, welche in den Nährböden scheinbar denselben fluorescierenden blaugrünen Farbstoff erzeugten, so z. B. den von *Flügge* im Jahre 1886 aus Wasser und Boden isolierten Bacillus fluorescens liquefaciens. Neben dem von *Gessard* entdeckten und von *Flügge* und *C. Fränkel* genauer beschriebenen Bacillus pyocyaneus, ermittelte *Ernst*[1]), dass es einen zweiten Mikroorganismus des blauen Eiters giebt, den er als Bacillus β dem α gegenüberstellte und der speciell in Hinsicht der Farbstoffproduktion, der Gelatineverflüssigung und namentlich des sogenannten Chamæleonphenomens auf der Kartoffelkultur vom *Gessard*'schen deutliche Unterschiede erkennen lässt. Diesen zwei Varietäten gesellte sich im Jahre 1893 eine dritte von *E. von Freudenreich*[2]) aus Wasser isolierte Abart zu, welche, bei sonst vollständiger morphologischer Uebereinstimmung, sich von den zwei erstgenannten bezüglich ihrer starken chromogenen Thätigkeit, namentlich auf Kartoffeln, und ihrer schwachen Virulenz unterscheiden sollte. Ausser dieser Varietät weist die Litteratur noch den Pyocyaneus pericard. *Harold-Ernst,* sowie den Bacillus pyocyaneus *Körber* auf.

Fassen wir nun diese Bacillenarten etwas näher ins Auge.

Nach der Litteratur[3]) sollen diesen beiden Bacillenarten sämtliche morphologische Merkmale gemeinschaftlich sein; von den biologischen Eigenschaften etliche auch, besonders die Eigenbewegung durch eine endständige Geissel oder ein Geisselbüschel, die Verflüssigung der Gelatine, und, wie schon bemerkt,

---

[1]) Zeitschrift f. Hygieine, Bd. II, 1887, p. 369.

[2]) Annales de Micrographie, 1893, p. 183.

[3]) Lehmann-Neumann-Atlas d. Bakt. II, p. 186. *Flügge:* Die Mikroorganismen 1896, II.

die Absonderung eines blaugrünen fluorescierenden Farbstoffes in günstigen Nährböden.

In morphologischer Hinsicht wäre nur der unter den Autoren noch immer herrschende Kontrast zu erwähnen bezüglich der Färbbarkeit dieser Bakterienarten durch die *Gram*'sche Methode: während frühere Forscher sie als unfärbbar bezeichneten, sollen nach *Zimmermann* sogar alle den Farbstoff zurückbehalten und nach *Lehmann* und *Neumann* von 12 untersuchten Arten nur 3.

Ich füge noch hier bei, obwohl diese Beobachtung schwerlich einen differentialdiagnostischen Wert erreichen kann, dass *A. Fischer*[1]) bei Bacillus fluorescens liquefaciens Rückgang der Plasmolyse in $K NO_3$ eintreten sah, bei Pyocyaneus nicht, so dass man die Membran des Bacillus fluorescens als mehr permeabel bezeichnen kann wie die von Pyocyaneus.

Nun musste sich aber die Forschung speciell mit diesen Pigmenten abgeben und wohl kann man heute sagen, dass wir über deren Natur, infolge wiederholter fleissiger Untersuchungen, so ziemlich im Klaren sind. Wie schon erwähnt, hatte *Fordos* im Jahre 1859 den blauen Farbstoff Pyocyanin aus grünem Eiter gewinnen können, indem er denselben aus den Kulturen durch Chloroform auszog und aus dieser Lösung in Form von langen blauen Nadeln gewann. *Gessard* erkannte dann im Jahre 1882 den Bacillus pyocyaneus als die Veranlassung zur Bildung des blauen und grünen Eiters, beziehungsweise des Pyocyanins. Trotzdem nun *Ledderhose*[2]) im Jahre 1888 die Bildung dieses Pyocyanins nicht als eine regelmässige und notwendige Begleiterscheinung des Wachstums der Bacillen des blaugrünen Eiters bezeichnete, und dass er dessen Bildung nur unter ganz bestimmten Ernährungsbedingungen zugab, traten *Charrin* und andere Forscher doch mit der bestimmten Behauptung auf, dass es sogar nur dieser durch Chloroform ausziehbare Farbstoff sei, der die Kulturen des Pyocyaneus von denen der anderen Fluorescentesarten unterscheide. Das Pyocyanin

---

[1]) Untersuchungen über Bakterien. Berlin 1894, 9.

[2]) Über den blauen Eiter. Deutsch. Z. f. Hyg.

teilt nämlich seinen Lösungen ganz charakteristische Eigenschaften mit.[1]) Chloroform. mit dem Nährboden zusammengeschüttelt, nimmt eine blaue Färbung an; verdünnte Säuren entfärben dieses Chloroform, nehmen das Pyocyanin auf und werden rosafarbig; wenn man nun dieser Lösung etwas Ammoniak hinzufügt, so wird sie wieder blau. . . .

Ledderhose giebt für Pyocyanin die chemische Formel $C_{14} H_{14} N_2 O$ an, obschon *Fordos* es als auch schwefelhaltig bezeichnete.

Dasselbe ist eine den Ptomainen nahestehende Base, deren Sulfat und Chlorid in rötlichen Nadeln kristallisieren und deren Lösungen kristallinisch gefällt werden durch Goldchlorid, Platinchlorid, Kaliumquecksilberjodid, Quecksilberchlorid, Tannin, Phosphormolybdensäure; ein Gemisch von Ferridcyankalium und Eisenchlorid geben mit Pyocyanin allmählich Berlinerblau.

Aber nicht nur Pyocyanin bildet sich als Stoffwechselprodukt des Bacillus pyocyaneus in den verschiedenen Nährböden; Pyoxanthin wurde auch nachgewiesen, und *Kunz*[2]) und *Babes*[3]) (1888 und 1889) konnten noch je 3 andere Pigmente isolieren und untersuchen. Drei Jahre später konnte ferner *Gessard* in einer Reihe von Arbeiten feststellen, dass diese Farbstoffbildungen von der Zusammensetzung des Nährmediums abhängig sind.[4]) Nach den Untersuchungen dieses Forschers und *Rohrer*'s[5]) ergab sich also, dass die Farbstoffproduktion nicht nur des Bacillus pyocyaneus, sondern auch sämtlicher fluorescierender Bakterienarten der Variabilität stark unterworfen ist und so sehr vom Nährboden abhängig ist, dass man durch Züchtung sogar farblose Varietäten erzielen kann.

Nur so kann man thatsächlich die weit auseinandergehenden Meinungen der verschiedenen Autoren begreifen und erklären.

---

[1]) *Charrin.* La maladie pyocyanique, p. 9.

[2]) Sitzber. der Wiener Akademie.

[3]) Compt. rend. de la Soc. biol.

[4]) Sur les pigments produits par le microbe pyoc. (La sem. med.) Nouvelles rech. sur le mic. pyoc. (Annales d. l'Int. Paris). Des races du bacille pyocianique 1891. Sur la fonction fluoresc. des microbes 1892.

[5]) Centralbl. f. Bakt. u. Par. 11, 327.

Abgesehen von den Arbeiten *Lepierres*[1]) über den Wert von Albumin, Extraktivstoffen u. s. w. für die Farbstoffbildung, beweisen noch *Jakowsky*[2]) und später *Sanfelice*[3]), dass die Anwesenheit von Sauerstoff zur Farbstoffbildung absolut notwendig ist. Dieser Stoff scheint aber die einzige unbedingt zum Pigmentierungsvermögen dieser Bakterien notwendige Substanz zu sein, denn auch die allgemein anerkannte Thatsache, dass dieselben keinen Farbstoff erzeugen, wenn der Nährboden keine Phosphate enthält[4]), wurde letzthin zum Teil von *Thumm*[5]) und definitiv von *M. Nicolle* und *Zia-bey*[6]) als hinfällig bewiesen.

Letztere Autoren haben gute Farbstoffbildungen in wässerigen Lösungen von nur Ammoniumlactat und Magnesiumsulfat erzielt.

Grosse Unsicherheit herrschte also bezüglich der Pigmente sämtlicher fluorescierender Bakterien im allgemeinen und in unserem Falle speciell des Pyocyaneus und Fluorescens liquefaciens, als Dr. *K. Thumm* in Karlsruhe eine grössere Arbeit unternahm, die zu den günstigsten Resultaten führte. Die produzierten Farbstoffe, oder etwa der produzierte Farbstoff soll nun nach diesen neuesten Untersuchungen nicht nur bei diesen zwei, sondern auch bei allen fluorescierenden Bakterienarten identisch sein. Da diese beiden Bakterien, unter dem Mikroskope beobachtet, farblos erscheinen, trotz des Pigmentes, welches immer wieder im Nährboden auftritt, so haben sich *Nägeli,*[7]) *Ledderhose*[8]), *Kunz*[9]) und *Beyerinck*[10]) die Bildung dieses Farbstoffes so erklärt, dass sie diese Pilze, welche sie chromopare oder echte Pigmentbakterien genannt haben, den Farbstoff als nutzloses Exkret ausscheiden lassen und zwar nicht als solchen

---

[1]) B. VIII, p. 95.
[2]) Zeitschrift f. Hygieine, XV, 474.
[3]) A. J. 92.
[4]) *Kunz, Gessard, Rohrer, Lehmann-Neumann.*
[5]) Beiträge z. Biologie fluor. Bakt., p. 86.
[6]) Annales de l'Inst. Pasteur 1897, No. 11, p. 669.
[7]) Untersuchungen über niedere Pilze, 1882.
[8]) Tagebl. deutsch. Naturf. Wiesbaden, 1887.
[9]) Sitzung, Ber. d. Wiener Acad., 1888.
[10]) B. 7, 1891.

präformiert, sondern in Form einer ungefärbten Vorstufe, eines Leukokörpers, der dann mit dem Sauerstoff der Luft erst sich zu dem gefärbten Produkt verbindet.

Gegen diese Erklärung trat nun *Thumm* auf und erwies sie als nicht zutreffend, indem er die Erscheinung in den Pyocyaneus- und Fluorescenteskulturen, wo thatsächlich die blaugrüne Fluorescenz nur an der Oberfläche derselben auftritt, dadurch erklärte, dass er annahm, dass wohl Farbstoff und Ammoniak nur an der Oberfläche der Kulturen gebildet werden, dass aber der Farbstoff früher und reichlicher in die unteren Flüssigkeitsschichten dringt wie Ammoniak, und da nun die gleichzeitige Anwesenheit dieser beiden Substanzen notwendig ist zur Wahrnahme des Fluorescierens des Nährbodens, so tritt die Farbstoffbildung *scheinbar* nur in den oberen Schichten desselben auf. So soll auch nach demselben Verfasser die α-Varietät des Bacillus pyocyaneus von der β- sich nicht durch die Bildung von verschiedenen Farbstoffen, sondern nur durch die Produktion verschiedener Mengen von Ammoniak unterscheiden.

Dieser fluorescierende Farbstoff, das Bakteriofluoresceïn, welcher, nach *Thumm*, von allen genannten Bakterienarten in den Nährböden abgesondert wird, ist trocken zitronengelb, amorph, in Wasser und verdünntem Alkohol löslich, in starkem Alkohol, Aether, Schwefelkohlenstoff, Chloroform unlöslich. Die wässerige Lösung ist konzentriert orange, verdünnt blass-gelblich und zeigt bei sauerer Reaktion keine Fluorescenz, bei neutraler eine blaue, bei alkalischer eine grüne. Die Fluorescenz der Kulturen ist anfangs blau, später, indem das von den Bakterien gebildete Ammoniak zunimmt, grün. Gegen Reduktionsmittel ist das Pigment unempfindlich, durch Chloroform wird es sogleich zerstört. Freilich widersprechen *Thumm*'s Ergebnisse den Resultaten aller früheren Forschungen gänzlich, und darum glauben *Lehmann* und *Neumann* [1]), dass die wahrscheinlichste Annahme bezüglich des Bacillus pyocyaneus die folgende sei: Es giebt Rassen, die Pyocyanin und Bakteriofluoresceïn zugleich

[1]) Atlas der Bakteriologie, II, p. 267.

bilden (Var. β *Ernst*), Rassen, die vorwiegend oder allein nur Bakteriofluoresceïn bilden (Var. α, Var. β nach langer Kultur auf künstlichen Nährböden), und endlich Rassen, die gar keinen Farbstoff bilden.

Die fluorescierende Substanz von Bacillus fluorescens liquefaciens ist zuerst von *Hoffer*[1]) untersucht und als Eiweisskörper erkannt worden, welcher auch nur in ammoniakalischer Lösung fluoresciert. Später, wie schon erwähnt, konstatierte *Thumm* diese Substanz als mit derjenigen von Bacillus pyocyaneus identisch.

Es wäre nun sehr interessant zu wissen, ob dieser Farbstoff oder diese Farbstoffe das Produkt einer chemischen Synthese seien, bewirkt durch die Lebensthätigkeit der erwähnten Bakterienarten, oder aber das Resultat der erfolgten Zerspaltung des Eiweissmolecüls. Sehr wenig Anhaltspunkte liefert uns diesbezüglich die Litteratur.

Was den Pyocyaneus anbelangt, so wurden von *Buchner*[2]) die im plasmatischen Zellinhalt desselben präformiert vorhandenen eiweissartigen Stoffe auch rein dargestellt. Diese Reindarstellung gelingt durch Auflösung derselben in verdünnten Alkalien und nachträglicher Ausfällung durch verdünnte Säuren; im Überschuss von Säure sind sie wieder löslich. Das Proteïn des Pyocyaneus dokumentiert sich durch die Xantoproteïn-, die *Millon*'sche, die *Biuret*- und die *Adamkiewicz*'sche Reaktion als Eiweisskörper. Beide sind löslich in Wasser, in verdünnten Alkalien, in konzentrierten Säuren; unlöslich dagegen in verdünnten Säuren. Durch Kochen, durch gesättigte Kochsalzlösung, durch Quecksilberchlorid wird keine Fällung erzielt, wohl aber durch Magnesiumsulfat, Kupfersulfat, Platinchlorid, Pikrinsäure, Gerbsäure, absolutem Alkohol. Das Pyocyaneusproteïn enthält 11,52 % Asche, welche hauptsächlich aus NaCl besteht, daneben aber Phosphorsäure enthält.

Die Zersetzungsprodukte des Eiweissmolecüls durch Pyocyaneus sollen nach *Jakowsky*[3]) Schwefelwasserstoff, Methyl-

[1]) Münch. med. Wochenschrift 91, No. 14.
[2]) Berlin. klin. Wochenschrift, 90, 673.
[3]) Zeitschr. für Hyg. u. Paras.-Kunde 15.

merkaptan, Buttersäure, Skatol, Skatolessigsäure neben Wasserstoff und Kohlensäure sein; bei Fluorescens liquefaciens wurden nur Pepton, flüchtige Fettsäuren, Ammoniak und zuletzt von *Flügge*[1]) auch Indol nachgewiesen.

Was das Sauerstoffbedürfnis dieser Bakterienarten anbelangt, so stimmen fast alle Autoren darin überein, dass sie dieselben als obligat-aërob bezeichnen; jedoch soll nach *Sanfelice*[2]) der Pyocyaneus auch in mit Paraffin bedecktem Agar wachsen können, sehr spärlich zwar und ohne scheinbare Bildung von Pigmente; und nach *Lubinsky*[3]) auch, welcher wahrnahm, dass derselbe sogar 7 Monate ohne Luftzutritt in ungeöffneten Abscessen leben konnte.

Weiter sind diese Bakterienarten noch bezüglich des Einflusses verschiedener Faktoren untersucht worden, nicht immer aber mit übereinstimmenden Resultaten. So soll z. B. der Bacillus pyocyaneus nach *Gessard* und nach *Lustig*[4]) Sporenbildung aufweisen, wogegen andere Forscher, in der allerletzten Zeit auch *Flügge*[5]), ihm diese Eigenschaft abstreiten.

Nach *D'Arsonval* und *Charrin*[6]) soll der Einfluss des elektrischen Stromes auf Pyocyaneus eine abschwächende Wirkung haben in Bezug auf dessen Farbstoffbildung.

Abschwächend soll auch auf beide Bakterienarten eine zu hohe Temperatur wirken, sowie verschiedene Antiseptika[7]); Druck, Gase, z. B. Leuchtgas, in deren Atmosphäre, nach *Klondakis*[8]), Pyocyaneus gar nicht wachsen kann, etc.

Auch die Virulenzfrage dieser Bakterienarten, namentlich selbstverständlich des Pyocyaneus, ist gründlich erörtert worden und für Bacillus fluorescens liquefaciens dahin beantwortet worden, dass er sowohl für Menschen wie für Tiere total

---

[1]) Die Mikroorganismen II, p. 346.
[2]) Annali dell' Istituto d'igiene. Roma 1896.
[3]) Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., 1894, p. 769.
[4]) Die Wasserbakterien, 1895.
[5]) Die Mikroorganismen, p. 291
[6]) C. R. de la Soc. de biol. 1893, 764. La médecine moderne, 1896, 71.
[7]) *Charrin* et *Phisalix*, 1892.
[8]) Inaugural-Dissertation, Berlin 1890.

harmloser Natur sei; wogegen der Erreger des blauen Eiters für Tiere pathogen, für Menschen aber als nicht krankheitserregend bezeichnet wird. Schon im Jahre 1887 stellte *Ledderhose*[1]) die Pathogenität des Pyocyaneus für Tiere fest; er bezeichnete es aber als wahrscheinlich, dass derselbe auch beim Menschen Eiterung erregen könnte.

Das Pyocyanin soll nach diesem Forscher nicht pathogen sein. *Charrin*[2]) untersuchte 1889 den Pyocyaneus gründlich auf sein pathogenes Verhalten Tieren gegenüber und es ergab sich, dass derselbe, subkutan oder intravenös eingespritzt, im Zeitraume von 24 Stunden bis vielen Wochen den Tod bewirken kann, und zwar unter sehr verschiedenen Krankheitserscheinungen, je nach der Menge und Beschaffenheit der eingespritzten Kultur. Die Frage der pathogenen Bedeutung desselben für den Menschen wurde durch sehr zahlreiche Experimente[3]) zuerst in diesem Sinne beantwortet, dass der Pyocyaneus im allgemeinen für den Menschen unschädlich sein soll; während *Charrin*[4]) ihm zuletzt eine für die menschliche Pathologie sehr grosse Bedeutung zuschreibt. Er soll nämlich als Erreger von Bronchopneumonie, Dysenterie, Otitis, Nephritis, Cystitis etc. erkannt worden sein.

Obschon *Charrin*[5]) die Scheidung des Bacillus pyocyaneus in α- und β-Varietät als nicht gerechtfertigt hinstellt, so scheint es doch, dass der *Gessard*'sche Pyocyaneus virulenter Natur sein soll wie der *Ernst*'sche, und dass die *Freudenreich*'sche γ-Varietät, wie schon erwähnt, fast keine merkbare Pathogenität aufzuweisen hat.

Überhaupt aber herrscht in der Litteratur eine grosse Unsicherheit bezüglich der verschiedenen aufgestellten Arten, Abarten und Varietäten, und zwar nicht nur des Bacillus pyocyaneus, sondern auch im allgemeinen aller fluorescierenden

---

[1]) Über den blauen Eiter. Bgrtner. 1887, 259.

[2]) La maladie pyocyanique. Paris.

[3]) Vergl. namentlich *Gruber, Rohrer, Martha, Maggiore* und *Gradenigo, Kruse* und *Pasquale, Monnier, Schimmelbusch, Oettinger* und *Neumann.*

[4]) La maladie pyoc. chez l'homme. (La sem. méd. 1896, p. 275).

[5]) *Baumgartner,* Bd. V, p. 329.

Bakterien. Was den Pyocyaneus anbetrifft, sei z. B. genug die von *Marion-Dorset*[1]) aufgestellte Abart zu erwähnen, deren charakteristische Eigenschaft die sein soll, auf Schraegagar schön ausgebildete Kristalle von Calciumphosphat mit Spuren von Magnesium auszuscheiden, welche Kristalle aber, wie sich aus späteren Untersuchungen von Dr. *J. Nowak* und Dr. *Liechanowsky*[2]) herausstellte, nichts anderes gewesen sein sollen, als gewöhnliche Salzkristalle, wie es sehr oft auch bei anderen Bakterienarten geschieht.

Weiter enthält die Litteratur, abgesehen von Bacillus fluorescens liquefaciens, der wohl als konstante Form dasteht, die Beschreibung einer Anzahl angeblich specifisch verschiedener Arten von Fluorescentes, so z. B. Bacillus fluorescens albus und longus *Zimmermann*, welche aber nach *Flügge* absolut nicht verdienen als Arten bezeichnet zu werden: Fluorescens tenuis, aureus, putidus u. s. w., welche alle höchstwahrscheinlich nicht gründlich untersucht worden sind, und denen *Flügge*, bei der grossen Variabilität der Fluorescentes sehr skeptisch gegenüber steht. Und thatsächlich scheint es, dass nirgends besser wie in diesem Falle die *Nægeli*'sche Lehre von der Mutabilität der Bakterien ihre Bestätigung findet.

So kommt es nun, dass die Differentialdiagnose aller dieser fluorescierenden Bakterienarten, so auch des Pyocyaneus, gegenüber dem Fluorescens liquefaciens, auf sehr grosse Schwierigkeiten stossen muss; und wenn wir diesbezüglich die Litteratur konsultieren, so finden wir thatsächlich sehr wenig Anhaltspunkte, um die eine Art von der anderen unterscheiden zu können.

Schlagen wir das neueste Handbuch der Bakteriologie auf, den *Lehmann-Neumann*'schen Atlas, so finden wir pag. 186 folgende Differentialdiagnose dieser zwei Bakterienarten:

Bacterium pyocyaneum Gessard: Intensive, meist blaugrüne Farbstoffbildung auf allen Nährböden, auch in Milch und

---

[1]) Contribution from the Biochem. Laboratory, Washington 1896.
[2]) Centralbl. für Bakt. 1896, II, 679.

Bouillon. Milch koaguliert bei alkalischer Reaktion, dann Koagulum gelöst. Pathogen für Tiere.

Bacterium fluorescens liquefaciens Flügge: Farbstoffbildung geringer, auf Bouillon sehr gering; Milch nicht koaguliert, später aufgehellt und grüngelblich gefärbt.

Es ist nun augenscheinlich, dass diese Unterscheidungsreaktionen nicht gerade viel bedeuten, und bei der oberwähnten Mutabilität dieser Bakterienarten auch nicht besonders sicher sind; und so stellte ich mir nun, auf Veranlassung und unter der bewährten Leitung meines hochverehrten Herrn Prof. *Tavel,* die Aufgabe, weiter diese Bacillen in morphologischer und biologischer Hinsicht zu studieren, um eventuell noch andere differentialdiagnostische Merkmale zu ergründen.

Methoden der Untersuchung.

Da meine Arbeit nicht die Erforschung einer speciellen, bestimmten Eigenschaft, morphologischer oder biologischer Natur, der besprochenen Bakterienarten zum Ziele hatte, sondern überhaupt eine objektive Darstellung sein sollte, eine vergleichende Studie, die nur dahin zu führen hatte, die Diagnose derselben zu erleichtern, so ist es selbstverständlich, dass ich dieselbe möglichst breit fassen musste, um alle besonderen Merkmale sämtlicher zu studierenden Bacillen zugleich und sicher ins Auge fassen zu können. Ich sollte also zuerst möglichst viele Pyocyaneus- und Fluorescentesarten und Abarten nach allen Richtungen hin zugleich und mit ganz prezisen Methoden experimentell untersuchen, deren etwaige Unterschiede zum Vorschein bringen, sie vergleichen, und, nach Verwertung des Beobachteten, mich besonders dem Studium der typischen Bacillus pyocyaneus *Gessard* und Fluorescens liquefaciens *Flügge* zuwenden, um weitere Experimente über diese so schwer zu unterscheidenden Bakterienarten eventuell zu differentialdiagnostischen Zwecken auszunützen.

Zur allgemeinen Untersuchung gelangten nun folgende Bakterienarten, welche sämtlich, mit Ausnahme der No. V, VI,

XV, von dem bakteriologischen Laboratorium von Kräl in Prag I, Kleiner Ring No. 11, bezogen wurden:

I	Bacillus	pyocyaneus	*α Gessard*
II	»	»	*β Ernst*
III	»	»	*γ Freudenreich*
IV	»	»	pericardit. *Harold-Ernst*
V	»	»	vom bakt. Institut *Tavel*
VI	»	»	strumit. Dr. *Lanz,* Bern
VII	Bacillus	fluorescens	liquefaciens *Flügge*
VIII	»	»	albus *Adametz*
IX	»	»	aureus *Zimmermann*
X	»	»	longus »
XI	»	»	tenuis »
XII	»	»	mesenteric. *Tartaroff*
XIII	»	»	putidus *Flügge*
XIV	»	»	capsulat. *Pottien*
XV	»	»	liquef. (zwei von mir aus Wasser isol. Rassen).

Eine vollständige Darlegung der Methoden, die ich zur bakteriologischen Untersuchung anwandte, kann hier wohl unterbleiben, obschon es jetzt festgestellt zu sein scheint, dass verschiedene Systeme der Untersuchung auch zu verschiedenen Endresultaten führen; im allgemeinen hielt ich mich an das vielerprobte und gutbewährte System, welches im Institute des Herrn Prof. *Tavel* üblich ist: die Farblösungen, die Nährböden, die Beizen wurden von mir persönlich und aufs sorgfältigste zubereitet; die mikroskopische Durchmusterung der Präparate, die Tierversuche und sonstige Experimente sämtlich unter Kontrolle ausgeführt. Eine kleine Abweichung von den im Institute üblichen Methoden machte ich bezüglich der Färbung der Sporen und Kapseln.

Zur Färbung der Endosporen ging ich nämlich folgendermassen vor:

1. Anfertigung des Präparates (nicht weniger wie 10 Mal rasch durch die Flamme zu ziehen!).

2. Das Präparat ist reichlich mit wässeriger Karbolfuchsinlösung zu bedecken und 1—2 Minuten über der Flamme zu halten (nicht kochen). Die verdampfende Farbstofflösung ist immer wieder durch neue zu ersetzen.

3. Abspülen mit einem Gemisch von 100 ccm. conc. Alkohol, 150 ccm. destilliertem Wasser und 50 Tropfen verdünnter Salzsäure.

4. Nachfärben mit Methylenblau. Diese Methode stellte sich als sehr empfehlenswert heraus, da man durch dieselbe die schön rot gebliebenen Sporen (die Bacillen erscheinen blau) sehr leicht und sehr deutlich wahrnehmen kann, namentlich wenn die Probe aus einer Kartoffelkultur entnommen wird. Zur Kapseldarstellung benutzte ich das *Johne*'sche Verfahren, das mir sehr einfach und zweckmässig erschien:

I. Erwärmen des Präparates mit 2% Gentianaviolettlösung bis zur Dampfentwickelung.

II. Abspülen mit Wasser.

III. Benetzen mit 2% Essigsäure; 6—10 Sekunden.

IV. Abspülen mit Wasser.

Abgesehen vom Bacillus capsulatus *Pottien*, der mir nach solcher Färbung unter dem Mikroskope als Kokkus erschien, konnte ich durch diese Methode auch bei zwei anderen Fluorescentesarten eine mutmassliche Kapselbildung wahrnehmen; da aber diese bei solchen Bacillen theoretisch ausgeschlossen ist, mag bei dieser Erscheinung wohl vielleicht eine optische Täuschung vorgelegen sein, wie es hie und da wohl der Fall zu sein scheint, da eine solche schon von *Nägeli* und *Schwendener*[1]) von der äusseren Fläche aus, sei es durch Reflexion, sei es durch Interferenz, erklärt worden ist.

Die Geisselfärbung gelang mir nur bei den Pyocyaneen vollkommen, wo ich zur Sichtbarmachung derselben auf je 20 ccm. der Beize 4—7 Tropfen Säure zusetzen musste.

Was die Nährböden zur Züchtung der Reinkulturen anbetrifft, so wandte ich, ausser den wie schon erwähnt, im Insti-

[1]) Das Mikroskop. Leipzig 1877.

tute üblichen Bouillon-, Milch-, Gelatine-, Agar- (Hochagar-, Schrägagar-, Agar- unter Paraffin, Agar mit Zucker, Kartoffelscheiben etc.), auch künstliche an, wie z. B. zum Zwecke der Isolierung des Farbstoffes, in welchem Falle sowohl der Pyocyaneus wie der Fluorescens liquefaciens in je einer Lösung von

Ammon. succinic.	25,00
Kalium phosphoric.	2,50
Magnes. sulfuric.	1,00
Aq. dest.	2500,00

eingeimpft und gezüchtet wurden.

Hier sei vorübergehend erwähnt, dass sie in eine sonst prozentual gleich zusammengesetzte Lösung mit Kalium- anstatt mit Ammon. succinic. nicht wachsen konnten, welche Erscheinung die Lehre bekräftigen kann, dass die Ammoniaksalze auch für die Bakterien zur Synthese der Proteïnstoffe notwendig sind, welche dann zum Aufbau der Zellen dienen.

Einen ganz charakteristischen Nährboden wandte ich an, um, auf Rat von Herrn Prof. *Tavel*, diese Bakterien bezüglich des Grades ihrer Anaërobiose zu prüfen. Bekanntlich werden sämtliche besprochenen Bacillenarten als obligat-aërob ausgegeben; nun handelte es sich darum, vielleicht Unterschiede differential-diagnostischer Bedeutung auch in dieser Hinsicht feststellen zu können: einige könnten mehr, andere weniger Bedürfnis nach Sauerstoff besitzen.

Die angewandte Methode ist nun die Verwertung für Reinkulturen der interessanten Studien *Beyerinck*'s [1]) über die sogenannten Bakterienniveaus, welche als Produkte antagonistischer Wirkungen verschiedener bewegungsrichtender Faktoren anzusehen sind. Diese Versuche wurden wie folgt angestellt:

In viele, ein paar Tropfen Agargelatine enthaltende Probierröhrchen, wurden die verschiedenen Bacillenarten eingeimpft, mit etwas sterilisiertem Wasser übergossen und im Temperaturoptimum der Ruhe überlassen.

Der Sauerstoff der Luft wird nun absorbiert und die Agargelatine diffundiert dabei nach und nach im Wasser ihre Nähr-

[1]) Centralblatt f. Bakter., Bd. XIV, 1893, 827.

stoffe. Es bildet sich also ein Bakterienniveau, d. h. eine dünne Schichte Bakterien an der Stelle, wo sich der von oben kommende Sauerstoff und der Diffusionsstrom der Nährstoffe aneinanderstossen. Die aëroben Bakterienarten werden dabei natürlich die Oberfläche suchen, wogegen die anaëroben am Boden bleiben werden; und je mehr sauerstoffbedürftig eine gewisse Bakterienart sein wird, um so schneller und um so höher wird sie ihr Niveau bilden. Obschon ich mit diesem Experimente zu keinem besonderen Resultate gekommen bin, so konnte ich damit doch feststellen, dass man gewissermassen den «Grad» der Anaërobiose einer Bakterienart messen kann. Ich klebte an jedes Röhrchen kleine, in Millimeter geteilte Papierstreifchen auf und so konnte ich nach 48 Stunden den Stand des Bakterienniveaus genau bestimmen. Charakteristisch ist es dabei, dass sich die Bakterien fast ausschliesslich am Rande des Röhrchens anhäufen, so dass das Niveau einen Ring bildet.

Die Differenz aber in der Anaërobiose dieser Bakterienarten ist, wie aus den Tabellen weiter zu ersehen ist, sehr gering.

Auch andere Nährböden mit Zusatz verschiedenartiger chemischer Reagentien benutzte ich, namentlich um eine etwaige Differenzierung des Pyocyaneus und Liquefaciens feststellen zu können. Über diese wird unten die Rede sein.

Die Tierversuche, die ich anstellte, konnten, nach den ausgezeichneten Arbeiten so vieler sachverständiger Aerzte und namentlich *Charrin*'s, selbstverständlich einzig und allein den Zweck verfolgen, zu erfahren, inwieweit sich die Virulenz der einen Abart Pyocyaneus von der anderen unterscheide, durch welche merkbare Symptome sich die Krankheit bei den Kaninchen manifestiere, ob wirklich der Bacillus fluorescens liquefaciens so harmloser Natur sei, und schliesslich bis zu welchem Grade man eine Pathogenität des Pyocyaneus als differentialdiagnostisches Merkmal gegenüber den Fluorescentesarten benutzen kann.

Diese Fragen, die ich mit meinen im Institute mit der grössten Aufmerksamkeit vorgenommenen Tierversuchen zu beantworten getrachtet habe, schloss sich später mit dem besonders virulen

erscheinenden Bacillus pyocyaneus pericardit. *Harold-Ernst* die Frage an, ob etwa die *Röntgen*'schen Strahlen auf diese Bakterienart eine Wirkung ausüben, oder ob die Elektrizität, so wie sie, nach *D'Arsonval* und *Charrin,* auf die Farbstoffbildung abschwächend wirkt, vielleicht auch auf die Pathogenität von Einfluss sei. Auch diese Frage konnte ich nun nach Thunlichkeit beantworten, da mir diesbezüglich die freundliche Hand des Herrn v. *Traczewski* einen prächtigen Apparat zur Verfügung stellte.

Dies ist also im allgemeinen der Weg, den ich bei meiner Arbeit eingeschlagen habe; es folgen nun ausführlich die Einzelheiten der hierher gehörigen Versuche.

Experimenteller Teil.

I.

In Nachstehendem versuche ich in tabellarischer Weise eine Übersicht über die verschiedenen Eigenschaften der von mir untersuchten fluorescierenden Bakterienarten zu geben und zwar nach dem von Herrn Prof. *Tavel* mir vorgelegten Schema.

In der Darstellung ihrer Merkmale muss ich mich selbstverständlich so viel als möglich zusammenfassen: wichtige Eigenschaften werde ich später besonders hervorheben. Zweckmässigkeitshalber muss ich auch die Morphologie der Bakterien ihrer Biologie vorangehen lassen.

Morphologie.

	Form	Grösse	Vacuolen	Kapseln	Geisseln	Gruppierung	Färbung
I Bac. pyoc. *a*	Schlanke Stäbchen	0,4-0,6 1,3 m.	keine	keine	1 endständig	kettenförmig	Normal; Gram färbt
II Bac. pyoc. *β*	Schlanke Stäbchen	0,5 bis 1,7 m.	keine	keine	etwa 4 endständig	zumeist einzeln	Normal; Gram färbt
III Bac. pyoc. *γ*	Schlanke Stäbchen	0,6 bis 1,5 m.	keine	keine	eine	kettenförmig	Normal; Gram färbt
IV Bac. pyoc. pericard.	Schlanke Stäbchen	0,3 bis 1,2 m.	keine	keine	3 od. 4	zu zweien	Normal; Gram färbt
V Bac. pyoc. Labor.	Schlanke Stäbchen	0,3 bis 1,2 m.	keine	keine	eine	einzeln	Gram färbt nicht

	Form	Grösse	Vacuolen	Kapseln	Geisseln	Gruppierung	Färbung
VI Bac. pyoc. strum.	Schlanke Stäbchen	0,3 bis 1 m.	keine	keine	eine	zu viere	Gram färbt
VII Bac. fluor. liq.	Schlanke Stäbchen	0,4 bis 1,5 m.	keine	keine	eine	einzeln	Gram färbt nicht
VIII Bac. fluor. albus	Ganz kleine Stäbchen	0,3 bis 0,8 m.	keine	keine	eine	einzeln	Gram färbt nicht
IX Bac. fluor. aureus	Stäbchen	0,5 bis 1,2 m.	keine	keine	1 Geisselbüschel	einzeln	Gram färbt schwach
X Bac. fluor. longus	Stäbchen	0,5 bis 1,4 m.	keine	keine	keine gesehen	kettenförmig	Gram färbt
XI Bac. fluor. tenuis	Stäbchen	0,4 bis 0,7 m.	keine	keine	keine gesehen	einzeln	Gram färbt
XII Bac. fluor. mesent.	Stäbchen	0,6 bis 1,4 m.	keine	nicht ausgeschlossen	keine gesehen	zu Haufen	Gram färbt schwach
XIII Bac. fluor. putidus	Stäbchen	0,5 bis 1,2 m.	keine	keine	mehrere	zu zweien	Gram färbt nicht
XIV Bac. fluor. capsul.	Dicke Stäbchen	0,6 bis 1 m.	keine	vorhanden	keine bemerkt	zu zweien	Gram färbt nicht
XV Bac. fluor. liquef. [1]	Stäbchen	0,4 bis 1,3 m.	keine	keine	keine bemerkt	kettenförmig	Gram färbt nicht
XVI Bac. fluor. liquef. [2]	Stäbchen	0,5 bis 1,2 m.	keine	keine	eine	kettenförmig	Gram färbt schwach

Biologie.

	Bacillus pyoc. α	Bac. pyocyan. β	Bac. pyoc. γ	Bac. pyoc. pericard.
Anaërobiose	Streng aërob; das Bakterienniveau steht nach 48 Std. 21 mm. vom Agarnährboden entfernt.	Obligat-aërob; nach 48 Std. ist das Meniskus 20 mm; nach 1 Woche ist es auf der Oberfläche.	Aërob; nach 48 Std. aber nur 10 mm. entfernt.	Streng aërob; in Hochagar kein Wachstum, nach 48 Std. 25 mm.
Temperatur	Bei 35° doppelt so schnelles Wachstum wie bei Zimmertemperatur.	Bruttemperatur als Optimum.	Wie Var. β.	Wächst bei 35° und bei Zimmertemperatur.
Bouillon	Trübt sich und bildet an der Oberfläche ein Häutchen; später fluoresciert schön hellgrün. Geruch aromatisch, nach trockenen Blumen.	Die Fluorescenz tritt erst am 4. Tage auf; sonst wie α.	Wie α.	Wie α.

	Bac. pyoc. α	Bac. pyocyan. β	Bac. pyoc. γ	Bac. pyoc. pericard.
Milch	Nach 24 Std. tritt Gerinnung ein, welche nach weiteren 24 Std. wieder aufgelöst ist; der Nährboden reagiert alkalisch; nach 10 Tagen ist die Milch schön orangegelb gefärbt.	Nach 10 Tagen fluoresciert der Nährboden an der Oberfläche nur schwach grünlich; sonst wie α.	Wie α.	Wie α.
Gelatine	Wächst von der Oberfläche allmählich nach unten, die Gelatine trichterförmig verflüssigend; sie fluoresciert zuerst schön blaugrün, später wird sie intensiv orangegelb. Keine Gasentwicklung.	Verflüssigt die Gelatine doppelt so schnell wie Var. α, sonst gleich.	Die Fluorescenz ist mehr grün; sonst wie α.	Sehr langsame, fast plattförmig schreitende Verflüssigung; sonst wie α.

	Bacillus pyoc. α	Bac. pyoc. β	Bac. pyoc. γ	Bac. pyoc. peric.
Agar	Wächst als hellgrüner Belag; gelbgrüne, später dunkelgrüne Fluorescenz. Nach 5 Tagen giebt Zuckeragar saure Reaktion.	Wächst als dunkelgrüne Auflagerung; im Zuckeragar keine Farbstoffbildung, saure Reaktion, keine Gasentwicklung.	Wie α.	Wie α.
Kartoffel	Rotgelbe, schleimige, matte Auflagerung; die Kartoffelscheibe schwärzt sich nach und nach.	Wie α; habe die von Ernst beschriebene «Chamæleon - Erscheinung» nicht beobachten können.	Wenn bei 35° gezüchtet, ist der Bakterienbelag prächtig grün, bei 20° rehbraun.	Die Kolonie ist orangegelb bis rötlich, mit schmierigem Glanz.
Sporenbildung	keine.	keine.	keine.	keine.
Beweglichkeit	Im hängenden Tropfen, v. Kondenswasser einer Schrägagarkultur entnommen, zeigt nach 24 Std. noch lebhafte Bewegung.	Sehr lebhaft, sich schlängelnd.	Wie β.	Wie β.

	Bac. pyor. Labor.	Bac. pyoc. strum.	Bac. fluor. liquef.	Bac. fluor. albus
Anaërobiose	Das Bakterien-Niveau steht nach 48 Std. 25 mm. vom Nährboden entfernt.	Aërob; in derselben Zeit 20 mm. entfernt.	Streng aërob; in 48 Std. 37 mm. hoch.	Das Bakterien-Niveau ist in 48 Std. 35 mm. nach oben gewandert.
Temperatur	Brut- und Zimmertemperatur.	35° als Optimum.	Zimmertemperatur; bei 35° ist der Wachstum sehr spärlich.	Zimmertemperatur.
Bouillon	Trübt sich schwach, bildet eine dünne Rahmhaut und riecht schwach aromatisch.	Starktrübe, leichte, goldgrünliche Fluorescenz; gut entwickelte Rahmhaut.	Der Nährboden wird trübe, färbt sich grünlich und hat einen eigentümlichen unangenehmen Geruch.	Leichte, gelbgrüne Farbstoffbildung; der Geruch ist fast null.
Milch	Wie bei *a*.	Wie bei *a*.	Keine Gerinnung. Nach 5 Tagen besitzt die Milch eine grünliche Färbung.	Total unverändert.

	Bac. pyoc. Labor.	Bac. pyoc. strum.	Bac. fluor. liquef.	Bac. fluor. albus
Gelatine	Sehr träge Verflüssigung, sonst wie *α*.	Die Gelatine fluoresciert goldgrünlich, sonst wie *α*.	Sehr schneller Wachstum, mit sackförmiger Verflüssigung. Blaugrünliche Fluorescenz; keine Gasentwicklung.	Keine Verflüssigung; Wachstum fast nur an der Oberfläche; sie färbt sich schön orangegelb, fluoresciert aber grün.
Agar	Ganz spärliches Wachstum; im Zuckeragar wird der Nährboden sauer; sonst wie *α*.	Der Belag ist zuerst weisslich; wird später fast rotgelb; Agar fluoresciert sehr schön goldgelb.	Starke, grüngelbe Auflagerung; der Nährboden fluoresciert prächtig blaugrün. Mit Zuckeragar sauere Reaktion.	Stark entwickelte, schmutzig-weissliche Kolonie. Der Nährboden fluoresciert blaugrün. Mit Zucker sauere Reaktion.
Kartoffel	Der Nährboden sieht etwas grünlich aus.	Fette, schleimige, braune Auflagerung.	Schmutzig-gelbe, später braune Kolonie; Kartoffel sonst unverändert.	Körniger Belag von grauer Farbe, an den Rändern gelb.
Sporenbildung	Keine sporentragende Bacillen beobachtet.	keine.	keine.	keine.
Beweglichkeit	Wie *α*.	Schnell, aalförmig.	Sehr rasch, sich schlängelnd.	Lebhaft.

	Bac. fluor. aureus	Bac. fluor. longus	Bac. fluor. tenuis	Bac. fluor. mesent.
Anaërobiose	Streng aërob; nach 48 Std. ist das Niveau 32 mm. hoch.	Aërob; nach derselben Zeit 25 mm.	Nach 48 Std. 30 mm.	Aërob; 38 mm.
Temperatur	bei etwa 24°.	Zimmertemperatur.	24°.	24°.
Bouillon	Etwas trübe, schön gelbgrün gefärbt mit einem leichten Häutchen auf der Oberfläche; geruchlos.	Getrübt; keine Farbenänderung, etwas stinkend.	Etwas gelbgrün fluorescierend; dünne Häutchenbildung; fast geruchlos.	Fast grasgrüne Fluorescenz; stinkend.
Milch	Unverändert.	Unverändert.	Unverändert.	Unverändert.
Gelatine	Keine Verflüssigung; Wachstum von unten nach oben, und gelbgoldene Färbung der Gelatine.	Nur auf d. Oberfläche gewachsen; verflüssigt nicht, fluoresciert schwach bläulich.	Keine Verflüssigung und gelbgrüne Fluorescenz des Nährsubstrates.	Verflüssigt nicht und nimmt eine grüne Fluorescenz an.

	Bac. fluor. aureus	Bac. fluor. longus	Bac. fluor. tenuis	Bac. fluor. mesent.
Agar	Auf Schrägagar hellgrau, später braun. Goldgelbe, prächtige Fluorescenz. Agar mit Zucker, neutr. Reaktion.	Starkes Wachstum; fluoresciert grünlich. In Zuckeragar nach 10 Tagen schwach sauere Reaktion.	Hellgrüne Fluorescenz. Zuckeragar wird sauer.	Wächst als graue glänzende Schichte. Agar wird gelbgrün.
Kartoffel	Spärliches Wachstum; Kolonie v. schön, orangegelber Farbe.	Gelbe, schmierige, sehr breit gewachsene Kolonie.	Dunkelgrauer körniger Belag.	Hellgraue, schmierige, an den Rändern rehbraune Auflagerung; charakt. glänzend.
Sporenbildung.	keine.	keine.	keine.	keine.
Beweglichkeit	Lebhaft.	Plumpe, langsame Bewegung.	Langsam.	Langsam.

	Bac. fluor. putidus	Bac. fluor. capsul.	Bac. fluor. liquef.[1]	Bac. fluor. liquef.[2]
Anaërobiose	Bakterien-Niveau nach 48 Std. 25 mm.	Streng aërob; 36 mm.	Meniskus: 38 mm.	Nach 48 Std. 32 mm.
Temperatur	Zimmertemperatur.	Zimmertemperatur.	Zimmertemperatur.	Zimmertemperatur.
Bouillon	Etwas getrübt, und fluoresciert gelbgrün. Geruch sehr unangenehm, nach Trimethylamin.	Fast keine Farbenänderung und kein Geruch.	Sehr trübe; fluoresciert nach 5 Tagen. Leicht grünlich. Geruchlos.	Trübe, mit voluminöser Rahmhaut; wie 1.
Milch	Keine Veränderung.	Unverändert.	Nimmt später eine leichtgrüne Farbe an; sonst unverändert.	Wie bei 1.

	Bac. fluor. putidus	Bac. fluor. capsul.	Bac. fluor. liquef.[1]	Bac. fluor. liquef.[2]
Gelatine	Gelatine nicht verflüssigt; fluoresc. gelblich grün. Keine merkbare Gasentwicklung, aber unangenehmen Geruch.	Nach 2 Monaten tritt Verflüssigung ein; auf der Oberfläche graugelbe Schicht. Grünliche Fluorescenz.	Trichterförmige Verflüssigung mit schleimiger Masse auf dem Grunde; Gelatine fluoresciert grünlich.	Sehr rasche sackförmige Vertiefung; prächtige blaugrüne Fluorescenz.
Agar	Glänzender, grauer Belag, aber geringe Farbstoffbildung. Mit Zucker Säurebildung.	Auf der Oberfläche graugelbe, körnige Schicht. Schwache Fluorescenz. Zuckeragar; neutrale Reaktion.	Fluoresciert grünlich; reicher Wachstum.	Stark gewachsen, graugelb; fluoresciert fast himmelblau.
Kartoffel	Spärlich entwickelt, rehbraun.	Hellgrau, an d. Rändern gelblich; matt.	Schleimige, zuerst gelbe, dann braune Schicht.	Wie 1.
Sporenbildung	keine.	keine.	keine.	keine.
Beweglichkeit	Rasche.	Sehr lebhaft.	Lebhaft.	Lebhaft.

II.

Tierversuche habe ich mit den verschiedenen Pyocyaneus-Abarten an je einem Kaninchen, sowie mit Bacillus fluorescens liquefaciens angestellt; ausserdem noch mit Kulturen von Bacillus pyocyaneus peric. *Harold-Ernst* nach erfolgter Einwirkung des elektrischen Stromes und der *Röntgen*'schen Strahlen. Alle diese Versuche wurden mit der subkutanen Einspritzung einer 3 Tage alten Bouillonkultur begonnen; die Farbstoffproduktion wurde dabei gehemmt und, wie ich mit Hülfe des *Wolffhügel*'schen Zählapparates wahrnehmen konnte, wurde auch die Zahl der lebenden Keime (etwa durch den chemischen Einfluss der Elektrolyse?) stark vermindert. Da nun nach früheren Versuchen schon festgestellt werden konnte, dass die *Röntgen*'schen Strahlen keine Wirkung ausüben auf Kulturen, die in Glasgefässen enthalten sind, so wandte ich in meinem Falle sterilisierte Celluloidkapseln an, welche ich vorher, mit Bouillonkultur ausgefüllt, $^1/_2$ Stunde der Wirkung eines Induktionsapparates (*Rumkorff*'sche Spule) von 45—50 cm. Funkenlänge ausgesetzt hatte.

Die Resultate dieser Tierversuche sind nun folgende:

	Bac. pyoc. α			Bac. pyoc. β			Bac. pyoc. γ		
Datum	Gewicht	Symptome	Temperatur	Gewicht	Symptome	Temperatur	Gewicht	Symptome	Temperatur
	Ko.		° C.	Ko.		° C.	Ko.		° C.
22. Jan.	1,450	**Bei 2 ccm.**	38	1,330	**Bei 2 ccm.**	37	1,800	**Bei 2 ccm.**	38
23. »	1,530		37,5	1,400		38	1,900		38,5
25. »	1,470	Keine auffallende Krankheitserscheinung.	38,5	1,360	Lokale Entzündung u. Abscess.	38,7	1,830	Keine Veränderung.	38
28. »	1,490		38	1,300		38,5	1,750		37,5
1. Feb.	1,640		38	1,450	Schmutzig-schwarze, sich ausdehnende Nekrose.	38	1,800	**Bei 7 ccm.** Ein trockenes, gelbes Geschwür; sonst gesund.	38
3. »	1,560		38,5	1,500		39	1,820		38
8. »	1,530	**Bei 7 ccm.**	38,5	1,570		38	1,830		38
9. »	1,460	Kleine Lokalentzündung; Appetitlosigkeit.	39	1,480	**Bei 7 ccm.**	39			
11. »	1,500		40	1,540	Die Nekrose breitet sich aus; keine Eiterung.	39			
17. »	1,430		39,5	1,600		39			
20. »	1,300	**Bei 20 ccm.**	39,5	1,720		38,5			
25. »	1,290	Nekrose an der Stelle der Einimpfung.	39,6	1,850	Normal.	39			
27. »	1,280		39,5						
1. März	1,400		39						

Bacillus pyocyaneus pericarditis Harold-Ernst.

Datum	Gewicht	Normale Bouillon-Kultur	Temperatur	Gewicht	Nach Wirkung des elektr. Stromes	Temperatur	Gewicht	Nach Wirkung der Röntgen'schen Strahlen	Temperatur
	Ko.		° C.	Ko.		° C.	Ko.		° C.
22. Jan.	1,100	**Bei 2 ccm.**	37	1,350	**Bei 2 ccm.**	38	1,600	Bei einer **5 ccm.** enthaltenden, direkt unter der Hautzerquetschten Kapsel: sich ausbreitende Nekrose, Appetitlosigkeit.	37,5
23. »	1,130		37	1,400		38,5	1,540		38
25. »	1,050	Appetitlosigkeit; breite schwarze Nekrose auf der Brust; die Haare fallen aus.	39	1,320	Abscess an der Stelle der Einimpfung; sonst normal.	39	1,520		39
26. »	1,060		38	1,410		38,5	1,560		39
28. »	1,040		39	1,360		39	1,510		39
1. Feb.	1,150		39	1,320	**Bei 10 ccm.**	39	1,500		39,5
3. »	1,240		39	1,200	Schwarzes, trockenes, sich ausdehnendes Geschwür. Appetitmangel. Nekrose.	39,5	1,380	Haarausfall; partielle Lähmung der Glieder, Eiterung auf der Brust.	40,5
8. »	1,180	**Bei 5 ccm.**	39	1,180		39,5	1,320		41
9. »	1,180	Das Geschwür auf der Brust nimmt zu; Atem kurz. Tod. Mit dem Herzblute eine Agarplatte gegossen. Kein Wachstum.	40	1,220		39,5	1,340		39
11. »	1,050		40,5	1,070		39	1,300		38,5
15. »	0,950		41,5	1,240		39	1,380		38,5
16. »	0,860			1,260	Bessert.	39	1,350	Zuletzt bessert.	39

	Bac. pyoc. Labor.			Bac. pyoc. strumit.			Bac. fluoresc. liquef.		
Datum	Gewicht	Symptome	Temperatur	Gewicht	Symptome	Temperatur	Gewicht	Symptome	Temperatur
	Ko.		° C.	Ko.		° C.	Ko.		° C.
22. Jan.	1,250	**Bei 2 ccm.**	38,5	1,830	**Bei 2 ccm.**	38	1,550	**Bei 20 ccm.**	39
23. »	1,290	Lokalentzündung an der Stelle der Einspritzung; Appetitmangel.	39	1,840	Trockenes, schmutzig-gelbes, sich ausbreitendes Geschwür.	39	1,500	Leichte Lokalentzündung, die später verschwindet.	39
25. »	1,230		39,3	1,840		39,5	1,580		39
28. »	1,300		39	1,800		39	1,610		39
1. Feb.	1,320		39	1,910	**Bei 10 ccm.**	39,5	1,650	Sonst normal.	39
3. »	1,200	**Bei 10 ccm.**	39,6	1,720	Sehr starke Entzündung und Nekrose; die Glieder ziehen sich zusammen; Mangel an Appetit. Zuletzt bessert.	39,5	1,690		39
8. »	1,290	Sehr ausgebreitete Nekrose auf der Brust; Schlafsucht.	39,6	1,630		40			
9. »	1,300		40	1,500		40			
11. »	1,290		39	1,600		40			
17. »	1,340		39	1,720		40			
20. »	1,320		39	1,800		39			
25. »	1,300	Bessert.	39						

III.

Da ich bei keinen meiner untersuchten Abarten die von *Charrin* als für Pyocyaneuskulturen charekteristisch bezeichneten Reaktionen wahrnehmen konnte, indem das Chloroform, tüchtig mit starkgefärbten Schrägagar-Kulturen geschüttelt, jedesmal total farblos blieb, so musste ich annehmen, dass die Pyocyanin-Bildung nicht eine specifische Eigenschaft des Pyocyaneus sei und dass infolge dessen diese Reaktionen gar keinen Wert zur Differentialdiagnose dieser Bakterienarten hätten. Um aber doch, wenn möglich, Reaktionen aufzustellen, durch welche man leicht und sicher die Kulturen von Pyocyaneus von denen des Fluorescens liquefaciens unterscheiden könnte, so wandte sich nun meine Aufmerksamkeit speciell auf ihre chemischen Leistungen und zuerst auf ihre Farbstoffstoffbildung. Dr. *K. Thumm* hat die Farbstoffe von Bacillus fluorescens tenuis, putidus, albus, Bacillus erythrosporus, viridans, pyocyaneus Ernst und Bacterium syncyaneum *a* untersucht und, wie schon erwähnt, völlig gleichartig gefunden.

Da die Methode, welche ich zur Isolierung der Farbstoffe des Bacillus pyocyaneus *a* und des Bacillus fluorescens liquef. anwandte, etwas von derjenigen dieses Forschers abweicht, da ich glaube, dass durch die Fällungen der Eiweissstoffe durch Alkohol ein grosser Farbstoffverlust stattfinden muss, so halte ich es für nützlich und zweckmässig, sie hier beide wiederzugeben.

Dr. *K. Thumm* schritt folgendermassen vor: Er versetzte 100 gr. der Kulturflüssigkeit mit 200 ccm. 96 % Alkohol und filtrierte sie nach zwölfstündigem Stehen von den ausgeschiedenen eiweissartigen Stoffen ab. Das Filtrat wurde nun zur Sirupkonsistenz eingedampft und nach weiteren 12 Stunden abfiltriert, mit cirka 100 ccm. Alkohol umgeschüttelt und nach 24 Stunden wieder abfiltriert. Der Niederschlag bestand jetzt aus Farbstoff, in Alkohol unlöslichen, eiweissartigen Substanzen und anorganischen Nährsalzen. Er nahm denselben mit etwas destilliertem Wasser auf, versetzte die Lösung mit Ammonium-

hydroxyd, dampfte sie nach dem Filtrieren ein und fällte aus derselben durch Alkohol den Farbstoff wieder aus. Dieser Farbstoff wurde nun mit 20 ccm. Wasser aufgenommen, durch Calciumhydroxydlösung von Phosphorsäure und Schwefelsäure befreit, eingedampft, mit Alkohol versetzt und nach einigen Stunden abfiltriert. Der Niederschlag bestand nun, ausser geringen Mengen von Calciumhydroxyd, das durch Kohlensäure gänzlich vertrieben wurde, allein aus Farbstoff. Dieser wurde im Wasser aufgelöst und durch Fällen mit Alkohol ganz rein erhalten.

Von mir wurde folgender Weg eingeschlagen: Aus den schon oben genannten alkalisch reagierenden Kulturen mit Ammon. succinic., Kalium phosphoric. und Magnes. sulfuric., fällte ich durch eine Bleiacetatlösung im Ueberschuss die Eiweisskörper und etwaige Spaltungsprodukte aus, filtrierte die Lösungen ab und befreite sie durch Schwefelammonium vom überschüssigen Blei. Die Filtrate konnten jetzt nur den Farbstoff, vielleicht einen Teil des Ammon. succinic. und anorganische Salze enthalten. Sie wurden zur Sirupdicke eingedampft und mit verdünnter Natronlauge versetzt, wobei sich ein voluminöser Niederschlag bildete. Die Filtrate davon reagierten stark alkalisch, besassen eine schön orange-gelbe Farbe und fluorescierten grün. Sie wurden nun eingedampft, 24 Stunden der Ruhe überlassen, wobei sich Kristalle anorganischer Salze ausschieden, abfiltriert und wieder langsam auf dem Wasserbad bis zum Trockenwerden eingedampft. Jetzt zog ich von diesen Residuen das noch vorhandene Natrium-, Kalium- und Ammoniumacetat mit conc. Alkohol aus, löste die zurückgebliebenen Farbstoffe in Wasser auf, und durch Fällen mit Alkohol erhielt ich nun aus beiden Lösungen das Pigment in Form eines braungelben amorphen Pulvers.

Da diese zwei so gewonnenen Farbstoffe im allgemeinen alle die von *Thumm* für seine untersuchten Bakterienarten beschriebenen Eigenschaften zeigten, denn sie waren im Wasser löslich, in Alkohol, Chloroform, Aether und Benzol unlöslich, und die wässerigen Lösungen derselben den relativen Kulturen auch bezüglich der Färbung gleich waren: Alkali bewirkte

nämlich Veränderung der Fluorescenz vom Blauen ins Grüne, Säure hob dieselbe total auf etc., so ist anzunehmen, dass sie mit denselben identisch sind. Sicher schienen diese zwei von mir isolierten Farbstoffe gleichartiger Natur zu sein, obschon beide wahrscheinlich nicht ein chemisches Individuum bilden, sondern ein Gemisch sind von zwei oder mehreren Farbstoffen. Jedenfalls sind sie aber in ihrer chemischen Zusammensetzung mit dem synthetisch dargestellten Fluoresceïn nicht identisch, denn mit der Bromierung von je einer kleinen Menge des isolierten Farbstoffes konnte ich in keinem Falle zu Eosin gelangen, welches doch so charakteristische Reaktionen aufweist, wogegen das gewöhnliche Fluoresceïn, von mir speciell zum Kontrollversuch herangezogen, sich sehr leicht zu Eosin, d. h. Tetrabromfluoresceïn, hatte bromieren lassen.

Die gründliche Erörterung dieser schwierigen Frage mag aber hier unterbleiben und, da mich dieser Versuch zu keinen positiven Resultaten differentialdiagnostischen Wertes geführt hatte, war es natürlich, dass ich einen anderen Weg nehmen sollte. Ich bereitete also zwei Bouillonkulturen, die eine mit Bacillus pyocyaneus und die andere mit Fluorescens liquefaciens und untersuchte nach 20 Tagen, inwiefern sie sich eventuell von einander unterscheiden liessen, und wie sich das Eiweiss unter der Wirkung der Bakterien verändert hatte. Beide Kulturen waren orangegelb gefärbt und wiesen Fluorescenz auf; bei Pyocyaneus dunkelgrün, bei Fluorescens aber fast grasgrün. Spektroskopisch untersucht, zeigten die beiden Kulturen keinen merkbaren Unterschied; Absorptionsstreifen waren nicht vorhanden.

10 % Tanninlösung (10 ccm. : 3 ccm.) brachte in beiden Kulturen, bei saurer Reaktion derselben, eine starke Trübung hervor, so aber, dass sie sich nach längerem Stehen etwas von einander unterscheiden liessen: die Pyocyaneuskultur blieb immer trübe, jedoch ohne merklichen Niederschlag, wogegen die Kultur der Fluorescens ganz klar und durchsichtig erschien mit einem geringen dunklen Niederschlag. Dreimal wiederholt, gab dieses Experiment dreimal dieselbe Erscheinung.

3 % Sublimatlösung (1 : 4) erzeugte keine merkbare Veränderung. Nach dem Kochen setzte sich sowohl bei der einen wie bei der anderen Kultur ein gelblicher Niederschlag ab. Die Fluorescenz verschwand.

5 % Bleiacetatlösung (1 : 3) brachte in keinem der beiden, mit 30 % Essigsäure angesäuerten Nährböden, einen augenfälligen Unterschied hervor.

30 % Essigsäure (1 : 3) erzeugte eine ganz verschiedene charakteristische Erscheinung: bei Pyocyaneus nahm die Kultur eine rosige Farbe an, bei Fluorescens trat eine weissliche Trübung auf; beide blieben dann beim Kochen unverändert.

Das *Esbach*'sche *Reagens* (1 : 2) rief keine Unterscheidungsmerkmale hervor. Die Fluorescenz der Nährböden trat aber hier, namentlich nach dem Erwärmen, viel stärker zum Vorschein.

Phosphorwolframsäure (1 : 1) erzeugte in den mit 10 Tropfen H_2SO_4 versetzten Kulturen bei 80° einen voluminösen Niederschlag, der bei der Fluorescenskultur etwas dunkler aussah als bei der Pyocyaneuskultur.

Xanthoproteïnreaktion. 10 ccm. der Bouillonkultur, sowohl des Pyocyaneus wie des Liquefaciens, mit einigen Tropfen HNO_3 ausgekocht, gab eine leicht gelbgefärbte Flüssigkeit, welche bei Zusatz von Ammoniak bis zur stark alkalischen Reaktion *nicht* tief orangegelb wurde, sondern ihre kanariengelbe Färbung behielt, was bezeugt, dass die Albuminoidsubsubstanzen des Bouillons sich total zersetzt hatten.

Die *Biuretreaktion* gab dieselben negativen Resultate, indem auch hier keine violettblaue Färbung entstand.

Formaldehyd (1 : 4) tötete die Bacillen sofort, rief aber keine besondere Erscheinung hervor: Farbe und Fluorescenz blieben unverändert.

IV.

Weiter in der Forschung der chemischen Leistungen dieser zwei Bakterienarten fortschreitend, stellte ich noch folgende Reaktionen auf:

1. *Ob die Farbstoffbildung auch in Phosphaten nicht enthaltenden Nährböden auftreten kann.* In 2 Kolben wurde je eine Lösung von Ammon. succinic. 1 · 00 gr., Magnes sulf. 0 · 05 in 100 gr. destilliertes Wasser hineingebracht, durch Kochen sterilisiert, mit Pyocyaneus resp. Fluorescens liquef. eingeimpft, während 10 Tagen im Brutschrank gehalten und nun auf Farbstoffbildung untersucht. Die Pyocyaneuskultur war schwach gelbgrün gefärbt und besass eine leichte grünliche Fluorescenz; die Fluorescens-Kultur war stark getrübt, dabei war aber weder Farbstoffbildung noch Fluorescenz wahrzunehmen.

2. *Nachweis von Pepton.* Sterilisierte Milch wurde je mit Pyocyaneus und Fluorescens liquefaciens eingeimpft und 5 Tage im Brutschrank stehen gelassen. Nun wurden alle Eiweisssubstanzen bis auf Pepton durch festes Ammoniumsulfat ausgefällt und etwas erwärmt. Der Niederschlag wurde durch Filtration entfernt, das Filtrat abgekühlt, mit Kalilauge alkalisch gemacht und tropfenweise mit einer 1 % Kupfersulfatlösung versetzt: die Pyocyaneus-Kultur wurde dabei schön rosafarbig, was Peptonanwesenheit verriet; die Fluorescens-Kultur blieb unverändert.

3. *Ob Stärke in Zucker verwandelt wird.* In zwei Spuren von Thymol enthaltenden Bouillonkulturen, die eine von Pyocyaneus, die andere von Fluorescens liquefaciens, wurde etwas 1 % Thymol enthaltende Stärkekleister eingegossen, gut geschüttelt und 12 Stunden bei Bruttemperatur gehalten. Durch die *Fehling*'sche Lösung konnte keine Kupferreduktion, also keine Zuckerbildung nachgewiesen werden.

4. *Ob Rohrzucker in Traubenzucker verwandelt wird.* Eine Pyocyaneus- und eine Fluorescens-Bouillonkultur wurden mit 1 % Karbolsäurelösung versetzt und, mit einer sterilisierten 2 % Rohrzuckerlösung übergossen, 24 Stunden im Temperaturoptimum sich selbst überlassen. Die *Fehling*'sche Lösung wurde durch diese Flüssigkeiten *nicht* reduziert, also ist der Rohrzucker unverändert geblieben.[1])

[1]) *Fermi* und *Montesano* hatten nachgewiesen, dass Bac. fluoresc. liq. ein invertierendes Ferment bildet (?).

5. *Ammoniakalische Harngährung.* Dazu gebrauchte ich die *Jack*'sche Nährlösung: Kalium phosphoric. 0 · 125, Magnes. sulf. 0 · 062, Kalium natrio-tart 5 · 00 auf 1 Liter Wasser; dieser sterilisierten Lösung wurden 3 gr. auf 106° trocken sterilisierte Urea pura hinzugesetzt, dieselbe in zwei Teile geteilt, welche je mit Pyocyaneus und Liquefaciens eingeimpft und gezüchtet wurden. Nach 5 Tagen konnte ich bei Fluorescens liquefaciens Umwandlung von Harnstoff in kohlensaures Ammoniak ($CO[NH_2]_2 + 2H_2O = [NH_4]_2CO_3$) mittelst *Nessler*'s Reagens feststellen.

6. *Nachweis von Schwefelwasserstoff.* In den Hals von 2 Pyocyaneus- und Fluorescens-Bouillonkultur-Röhrchen brachte ich mittelst des Wattepfropfens je ein mit Bleiacetatlösung getränktes Papierstreifchen hinein. Ich konnte keine Veränderung in der Farbe derselben wahrnehmen.[1])

7. *Ammoniaknachweis.* Wie oben wurden feuchte Papierstreifchen mit *Nessler*'s Reagens aufgehängt und in beiden Röhrchen nahmen dieselben eine braunrote Farbe an, was auf Ammoniakbildung hindeutet.

8. *Nachweis von Indol.* Je eine 10 Tage alte Pyocyaneus- und Fluorescens-Bouillonkultur wurden mit etwa einem halben Volumen 10 % H_2SO_4 und einigen Tropfen einer $^1/_2$ ‰ Natriumnitritlösung versetzt und einige Zeit auf etwa 80° erwärmt. Bei keiner stellte sich die charakteristische rosa- bis blaurote Farbe ein.

9. *Phenolnachweis.* Nach Zusatz von je $^1/_5$ ihres Volumens Salzsäure wurden hierauf je eine Pyocyaneus- und Fluorescens-Bouillonkultur abdestilliert. Bei keiner war Anwesenheit von Phenol nachzuweisen, da Bromwasser im Destillat keine Flocken erzeugte.

---

[1]) *Jakowsky* hatte bei Pyocyaneus Bildung von H_2S beobachtet.

Ergebnisse der Untersuchung.

Im Vorhergehenden habe ich nach Möglichkeit die Ausführung, den Verlauf und zum Teil auch die Resultate der von mir vorgenommenen Experimente beschrieben; es handelt sich nun noch darum, die ausgeforschten Thatsachen zusammenzufassen. Ich werde mich dabei möglichster Kürze befleissen.

In morphologischer Hinsicht weisen die untersuchten Bakterienarten keinen besonderen Unterschied auf: alle sind kleine schlanke Stäbchen von kaum schwankender Grösse; Vacuolen sind bei keiner Art, Kapselbildung nur bei Fluor. capsulatus und wahrscheinlich auch bei Mesentericus wahrgenommen worden. Geisseln sind sehr schön bei allen Pyocyaneus-Varietäten zu sehen, nicht so bei den Fluorescenten. Die Gruppierung schwankt je nach den Nährböden.

Die *Gram*'sche Färbungsmethode trifft bei den Pyocyaneen prächtig zu; nicht so schön und so sicher bei den «Fluorescentes».

Auch die Biologie dieser Bakterienarten verschafft uns kaum, wie aus den Tabellen ersichtlich ist, sichere Anhaltspunkte zu deren Differenzierung. Sie sind alle streng aërob, mit ganz unbedeutenden Unterschieden im Grade ihrer Anaërobiose. Das Temperaturoptimum ist für Pyocyaneus und dessen Abarten 35° C, für den Fluorescentes die Zimmertemperatur. Pyocyaneus β erzeugt Farbstoff nur wenn im Brutschrank gezüchtet; die γ-Varietät weist die besprochene, intensiv grüne Fluorescenz der Kartoffel, nur wenn bei 35° gehalten, auf.

Aus der Züchtung derselben in Bouillon-, Milch-, Gelatine-, Agar- und Kartoffelkulturen geht hervor, dass die Pyocyaneus-Varietäten in Bouillon einen besonderen Riechstoff entwickeln, was bei den Fluorescentes, mit Ausnahme des Putidus, nicht der Fall ist.

Die Eiweissstoffe der Milch werden nur vom Pyocyaneus peptonisiert; Trypsinbildung tritt nicht bei allen ein, da der Fluor. albus, aureus, longus, tenuis, mesentericus und putidus

nicht die Eigenschaft besitzen, Gelatine zu verflüssigen. Das Wachstum auf Kartoffeln ist besonders hervorzuheben, da es sehr charakteristisch und für eine jede Abart fast *specifisch* ist. Sporenbildung wurde *nicht* konstatiert; die Beweglichkeit ist bei allen sehr stark.

Was die Virulenzfrage derselben anbetrifft, so geht es aus meinen Versuchen hervor, dass der Bac. fluor. liquefaciens wirklich total harmloser Natur ist, und dass alle untersuchten Pyocyaneus-Abarten mehr oder weniger sich als für Tiere — wenigstens für Kaninchen — pathogen herausgestellt haben. Es mag dahingestellt bleiben, welche Degeneration der inneren Organe dabei stattfindet; bei allen zum Experiment benutzten Kaninchen wurde aber eine lokale Entzündung, ein nekrobiotischer Prozess und Fieber beobachtet; mit Pyocyaneus pericarditis unterlag sogar ein Tier infolge der Einimpfung. Da ich aber im Blute des verstorbenen Kaninchens keine Anwesenheit von irgendwelchen Bakterien wahrnehmen konnte, so folgt daraus, dass diese Bakterien nur eine lokale Infektion bedingten und dass der Tod durch Toxemie erfolgte. Weiter beobachtete ich, dass, je grösser die Dosis der eingeimpften Kultur war, um so schneller und um so akuter auch der Infektionsprozess verlief.

Die abgesonderte toxische Substanz kann aber nicht das Pyocyanin sein, denn in keiner Kultur konnte dessen Anwesenheit festgestellt werden. Es geht aus diesen Experimenten auch hervor, dass die Elektrizität einen auch für die Virulenz dieser Bakterienarten abschwächenden Einfluss besitzt, und dass die *Röntgen*'schen Strahlen von gar keiner Wirkung sind. Infolge der Mutabilität dieser Bakterien, je nach den Lebensbedingungen unter welche sie gestellt werden, ist es nun sehr schwer, Art von Abart und Varietät zu unterscheiden; sicher aber bilden Bacillus pyocyaneus mit seinen Varietäten, sowie Bacillus fluor. liquefaciens, zwei konstante Formen. Die Varietäten der einen, sowie der anderen Form weichen von derselben nur bezüglich der Intensität der Farbstoffbildung und der Virulenz ab, zwei bekanntlich bei allen Bakterienarten sehr variable Eigenschaften. Bacillus fluoresc. albus, longus und tenuis können wohl als

ein und dieselbe Form angesehen werden; Bacillus fluor. aureus und putidus besitzen ziemlich specifische Merkmale; nicht so der Bacillus fluorescens mesentericus und capsulatus, welche nur in einer zweifelhaften Kapselbildung sich von einander unterscheiden lassen.

So kam es nun, dass zur weiteren Untersuchung nicht sämtliche Abarten herangezogen wurden, sondern von allen bis auf Bac. pyocyaneus *Gessard* und Bac. fluor. liquef. *Flügge* abgesehen wurde.

Der Farbstoff — das Bakteriofluoresceïn — ist bei beiden identisch und wahrscheinlich dem von *Thumm* isolierten gleich; er scheint nicht ein chemisches Individuum, sondern ein Gemisch zu sein; jedenfalls ist er nicht dem synthetisch dargestellten Fluoresceïn gleich.

10 % Tanninlösung und 30 % Essigsäure sind gute, wenn nicht sichere Reagentien zur Unterscheidung der Bouillonkulturen. Das Sublimat, das Bleiacetat, das *Esbach*'sche Reagens, die Phosphorwolframsäure, das Formaldehyd, die Anwendung der Xanthoproteïn- und der Biuretreaktionen rufen in denselben Veränderungen hervor, haben aber keinen differentialdiagnostischen Wert.

Phosphate im Nährboden sind für das Wachstum dieser Pilze nicht nötig, wohl aber für die Farbstoffbildung bei Fluorescens liquefaciens. *Warum?* Bacillus pyocyaneus reduziert die natürlichen Albuminoidsubstanzen zu transformierten, d. h. Albuminoide, Globuline und Kaseïne zu Peptonen. Keine der beiden Arten verwandelt Stärke in Zucker, keine Rohrzucker in Traubenzucker.

Bacillus fluorescens liquefaciens ruft ammoniakalische Harngährung hervor. Beide sind Ammoniakbildner; Schwefelwasserstoff, Indol, Phenol konnten nicht nachgewiesen werden.

Demnach können also die Hauptmerkmale irgendwelchen differentialdiagnostischen Wertes für Bacillus pyocyaneus speciell und für Bacillus fluorescens liquefaciens etwa folgendermassen aufgestellt werden:

	A. Bac. pyocyaneus	B. Bac. fluor. liquef.
Form und Gruppierung.	Schlanke, zumeist kettenförmig gruppierte 0 · 4 — 0 · 6/1 · 3 und grosse Stäbchen. Eine endständige Geissel.	Zierliche, zumeist einzeln gruppierte, 0 · 5/1 · 4 u. grosse Bacillen. Eine endständige Geissel oder ein Geisselbüschel.
Färbbarkeit.	Die normale; Gram färbt immer.	Die normale; Gram färbt nicht regelmässig.
Temperatur.	Temperaturoptimum bei 35°.	Temperaturoptimum bei etwa 24°.
Kapsel- u. Sporenbildung.	Keine.	Keine.
Milch.	Peptonbildung; leichte Färbung des Nährbodens.	Keine Peptonbildung; keine Farbstoffbildung.
Gelatine.	Verhältnismässig langsame Verflüssigung derselben.	Rasche Verflüssigung d. Nährbodens.
Bouillon.	Entwickelung von Riechstoffen, b. blaugrüner Fluorescierung derselben.	Keine Entwickelung von Riechstoffen; der Nährboden fluoresciert hell-grün.
Agar.	Energische Farbstoffbildung; hellgrauer Belag; der Nährboden wird dunkelblau-grün.	Viel schwächere Farbstoffbildung; der Nährboden fluoresciert fast grasgrün.
Kartoffel.	Auf alkalisch reagierenden Scheiben nimmt der Belag eine grüne Fluorescenz an.	Der schmierige Belag bleibt immer braun-gelb.
Anaërobiose.	Ist aërob.	Ist streng aërob.

	A. Bac. pyocyaneus	B. Bac. fluor. liquef.
Pathogenität.	Ist für Tiere, pathogen, bei merkbarer Lokalentzündung und nekrobiotischem Prozesse.	Ist für Tiere total harmloser Natur.
Sonstige specifische Eigenschaften.	Essigsäure erzeugt in älteren Kulturen eine rosa Färbung.	Essigsäure ruft keine Veränderung des Nährbodens hervor.
	Entwickelt keine ammoniakalische Harngährung.	Ruft ammoniakalische Harngährung hervor.
	Kann auch in Phosphaten nicht enthaltenden Nährböden Farbstoff erzeugen.	Erzeugt in Phosphaten nicht enthaltenden Nährböden keinen Farbstoff.

Zuletzt sei es mir an dieser Stelle gestattet, Herrn Prof. Dr. *Tavel* und Herrn Dr. E. *von Freudenreich* für die mir erteilten Ratschläge, für die gütigst gewährte Benützung von Büchern und Apparaten, und für deren Unterstützung überhaupt bei meiner Arbeit, meinen wärmsten Dank auszusprechen.